

10/582196

## Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR04/003030

International filing date: 23 November 2004 (23.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR  
Number: 10-2003-0091398  
Filing date: 15 December 2003 (15.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 03 January 2005 (03.01.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

PCT/KR 2004 / 0 0 3 0 3 0

RO/KR 2 6. 1 1. 2004



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto  
is a true copy from the records of the Korean Intellectual  
Property Office.

출 원 번 호 : 10-2003-0091398  
Application Number

출 원 년 월 일 : 2003년 12월 15일  
Date of Application DEC 15, 2003

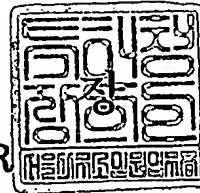
출 원 인 : 씨제이 주식회사  
Applicant(s) CJ Corp.



2004 년 11 월 23 일

특 허 청

COMMISSIONER



## 【서지사항】

【서류명】 특허출원서  
【권리구분】 특허  
【수신처】 특허청장  
【제출일자】 2003.12.15  
【발명의 명칭】 트립토판 생합성 관련 변이유전자를 함유한 대장균 변이주 및 이를 이용한 트립토판 제조방법  
【발명의 영문명칭】 E.coli mutant strain containing mutant genes related with Tryptophan biosynthesis and Production method of Tryptophan by using the same  
【출원인】  
【명칭】 씨제이 주식회사  
【출원인코드】 1-1998-003466-9  
【대리인】  
【성명】 이덕록  
【대리인코드】 9-1998-000461-7  
【포괄위임등록번호】 1999-001584-7  
【발명자】  
【성명의 국문표기】 박영훈  
【성명의 영문표기】 PARK,Young Hoon  
【주민등록번호】 511229-1010425  
【우편번호】 463-703  
【주소】 경기도 성남시 분당구 구미동 무지개대림아파트 111동 102호  
【국적】 KR  
【발명자】  
【성명의 국문표기】 임상조  
【성명의 영문표기】 LIM,Sang Jo  
【주민등록번호】 691110-1149511  
【우편번호】 449-845  
【주소】 경기도 용인시 죽전2동 501번지 동성1차아파트 103동 1602호  
【국적】 KR  
【발명자】  
【성명의 국문표기】 김병훈  
【성명의 영문표기】 KIM,Byoung Hoon

00091398

출력 일자: 2004/11/24

【주민등록번호】	771222-1018022
【우편번호】	405-741
【주소】	인천광역시 남동구 만수1동 삼환아파트2단지 205동 1205호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김성준
【성명의 영문표기】	KIM, Seong Jun
【주민등록번호】	570411-1019217
【우편번호】	441-390
【주소】	경기도 수원시 권선구 권선동 1235 풍림신안아파트 307-1001
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	임호수
【성명의 영문표기】	LIM, Ho Soo
【주민등록번호】	701201-1251713
【우편번호】	467-812
【주소】	경기도 이천시 마장면 덕평1~2리
【국적】	KR
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	사단법인 한국종균협회
【수탁번호】	KCCM-10534
【수탁일자】	2003.11.28
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인 이덕록 (인)
【수수료】	
【기본출원료】	20 면 29,000 원
【가산출원료】	0 면 0 원
【우선권주장료】	0 건 0 원
【심사청구료】	0 항 0 원
【합계】	29,000 원
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 미생물기탁증명서_1통

## 【요약서】

## 【요약】

본 발명은 트립토판(tryptophan)을 생산하는 대장균 변이주 CJ285 (KCCM-10534)로부터 유래한 트립토판 생합성에 관련한 유전자 *aroF*, *aroG*, 트립알(*trpR*) 및 타이알(*tyrR*)을 암호화하는 유전자 염기서열 및 아미노산 서열을 밝히고, 상기 변이 유전자를 단독 혹은 다중으로 보유하는 대장균 CJ285를 이용하여 포도당이 함유된 배지에서 직접 발효법으로 배양하여 배양액 내에 L-트립토판을 축적시키는 제조방법에 관한 것이다.

## 【대표도】

도 1

## 【색인어】

대장균, L-트립토판, *aroF*, *aroG*, 트립알(*trpR*), 타이알(*tyrR*)

## 【명세서】

## 【발명의 명칭】

트립토판 생합성 관련 변이유전자를 함유한 대장균 변이주 및 이를 이용한 트립토판 제조방법{E.coli mutant strain containing mutant genes related with Tryptophan biosynthesis and Production method of Tryptophan by using the same}

## 【도면의 간단한 설명】

도 1은 aroF 유전자 내부 서열 중 CCT가 [TCT]로 돌연변이가 일어남으로 인하여 280번째 아미노산인 프롤린(Proline)이 세린(Serine)으로 변화된 변이유전자를 나타낸 것이다.

도 2는 aroG 유전자의 프로모터 부위 중 T 염기가 [C] 염기로 돌연변이가 일어났으며, 유전자 내부 서열 중 GTG가 [GCG]로, TGC가 [CGC]로 돌연변이가 일어남으로 인하여 각각 57번째 아미노산인 발린(Valine)이 알라닌(Alanine)으로, 61번째 아미노산인 시스테인(Cysteine)이 아르기닌(Arginine)으로 변화된 변이유전자를 나타낸 것이다.

도 3은 trpR 유전자 내부 서열 중 704번째 G 염기가 결손됨으로써 단백질로의 번역시 번역틀이 변화됨으로 인하여 야생형 유전자 대비 23개의 아미노산 [cgattgattttgttaggcctgataagacgtggcgcatcaggcatcgtgcaccgaatgccggatgcggcgtga]이 추가된 변이유전자를 나타낸 것이다.

도 4는 tyrR 유전자 내부 서열 중 GGC가 [GAC]로, CTG가 [CTA]로 돌연변이가 일어남으로 인하여 각각 25번째 아미노산인 글리신(Glycine)이 아스파르테이트(Aspartate)로, 86번째 아미노산인 류신(Leusine)은 변하지 않은 무의미 돌연변이가 된 변이유전자를 나타낸 것이다.

## 【발명의 상세한 설명】

## 【발명의 목적】

## 【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<5> 본 발명은 트립토판 생합성 변이유전자를 단독 혹은 다중으로 함유하는 트립토판을 생산하는 대장균 변이주 CJ285 (KCCM-10534) 및 상기 변이주를 이용한 트립토판 제조방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 본 발명은 N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘 (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, 이하 NTG)을 반복해서 처리한 후 트립토판 유사체인 트립토판 하이드록사메이트(Tryptophan Hydroxamate, 이하 THX) 내성을 부여한 트립토판 생산 변이주 CJ285 유래의 DAHP 신세이즈(DAHP synthase)의 이소엔자임(isoenzyme)을 암호화하는 *aroF*와 *aroG*, 그리고 트립토판 생합성에 관여하는 *trp*, *aroH*, *mtr*, *trpR* 및 *aroL* 오페론을 조절하는 *trpR*과 *aroF-tyrA*, *aroG* 및 *aroP* 오페론을 조절하는 *tyrR* 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열을 밝히고, 상기 유전자들을 단독 혹은 다중으로 함유하는 변이균주를 포도당이 함유된 배지에서 직접발효법에 의해 L-트립토판을 생산하는 방법에 관한 것이다.

<6> 트립토판은 필수아미노산의 일종으로 사료첨가제, 수면효과나 정신안정효과가 있어 수액제 등의 의약품 원료 및 건강식품 소재 등으로 널리 사용되어 왔다. 트립토판 제조방법에는 화학합성법, 효소반응법, 미생물을 이용한 발효법 등이 있으나, 화학합성법의 경우에는 고온, 고압의 조건이 필요하고 그 산물에 D형, L형이 혼재하기 때문에 정제과정이 쉽지 않으며, 효소반응법의 경우, 예컨대 일본에서 공보된 바 있는 마쓰이 도오아쓰이 특허(대한민국 특허공고 90-005773)에서의 효소반응법의 경우는 기질로 사용되는 인돌과 세린의 가격이 고가일 뿐만 아니라 효소가 안전하지 못하다는 문제가 있었다.

<7> 한편, 종래의 미생물에 의한 트립토판의 생산은 대장균과 코리네박테리움 등 다양한 미생물의 영양요구성 균주와 조절 부위 변이 균주에서 이루어져 왔으며, 1980년대 들어서면서 유전자 재조합 기술이 급격히 발달하여 대사과정과 그 조절기작들이 자세히 규명됨에 따라 많은 연구자들이 유전자 조작 기법을 이용하여 우수한 재조합 균주들을 개발하는데 큰 성과를 거두었고 고도의 생산성 향상을 가져왔다(Matsui 등, 1988). 미생물을 이용한 직접발효법으로 트립토판을 생산한 국내특허로는 트립토판 내성을 갖거나 영양 요구성을 갖는 변이 균주를 이용한 경우(대한민국 특허공고 87-1813, 90-8251, 92-7405)와 재조합 균주를 이용한 경우(대한민국 특허공고 90-5772, 91-5627)가 있다. 이러한 트립토판 유사체 내성균주들은 주로 트립토판 생합성 과정에서 효소들의 피드백 저해를 극복하는 것을 주된 목표로 하였고, 재조합 균주들 역시 트립토판 생합성 과정에서 효소들의 클로닝에 목표를 두었으며 모두 실제로 괄목할 만한 성과를 가져왔다. 그러나, 종래의 대장균 인공변이주를 이용한 L-트립토판 생산 방법은 값싼 배양기질을 사용하여 발효법에 의해 L-트립토판을 생산한다는 장점은 있었지만, 결정적으로 트립토판의 생산성이 낮다는 문제점이 있었다. 이에 본 발명자들은 유전자 재조합 기술을 통하여 트립토판 생산성을 보다 극대화하기 위해서는 모균주로서 우수한 인공변이주의 확보 및 조절이 해제된 유전자 확보가 필요하다고 판단하였다.

<8> 따라서, 본 발명의 목적은 트립토판을 생산하는 대장균 변이주 CJ285 유래의, 트립토판 생합성 과정 중 방향족 아미노산의 최초 전구물질인 3-디옥시아라비오노헵-톨로소네이트 7-포스페이트(3-deoxyarabionohep-tulosonate 7-phosphate, 이하 DAHP)을 포스포에놀파이루베이트(Phosphoenolpyruvate)와 에리소르제 4-포스페이트(Erythrose 4-phosphate)로부터 합성하는 효소들인 *aroF*와 *aroG*를 암호화하는 변이유전자 및 트립토판 합성에 관여하는 유전자들의 전사



(transcription)를 조절하는 trpR과 tyrR 변이유전자의 염기서열과 이로부터 번역되는 아미노산 서열을 밝히는데 있다.

<9> 본 발명의 다른 목적은 상기 변이유전자를 단독 혹은 다중으로 보유하는 L-트립토판을 생산하는 대장균 변이주를 제공하는데 있다.

<10> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 변이체를 포도당이 함유된 발효배지에서 직접 발효법으로 배양함으로써 고농도, 고수율의 L-트립토판 생산방법을 제공하는데 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<11> 본 발명은 상기의 목적을 달성하기 위하여, 트립토판 생산 모균주인 대장균 CJ181(KFCC 10902)에 NTG를 반복처리하여 돌연변이를 유발한 후 트립토판 유사체인 THX에 대한 내성을 부여하여 모균주에 비해 트립토판 생산이 현격히 우수하게 나타나는 변이주 CJ285를 선별하고, 그로부터 트립토판 생합성 과정 중 방향족 아미노산의 최초 전구물질인 DAHP를 합성하는 효소 aroF와 aroG, 그리고 트립토판 생합성에 관여하는 trp, aroH, mtr, trpR 및 aroL 오페론을 조절하는 trpR 단백질과 aroF-tyrA, aroG 및 aroP 오페론을 조절하는 tyrR 단백질을 암호화하는 유전자를 클로닝하여 그 염기서열을 분석, 결정하여 야생형 유전자의 염기서열과 비교함으로써 돌연변이가 일어난 부분을 확인하였으며, 이러한 변이유전자, aroF, aroG, trpR 및 tyrR을 단독 혹은 다중으로 보유하는 CJ285 균주를 포도당을 포함하는 발효배지에서 직접 발효법으로 배양하여 모균주에 비해 트립토판 생산성이 크게 향상되었음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

<12> 결론적으로, 상기 대장균 CJ285 균주는 유전자 재조합 기술을 통하여 트립토판 생산성을 보다 극대화하기 위한 균주로서 적합할 뿐만 아니라 기존에 전혀 공지된 바 없는 신규한 균주임이 확인되었다.

【발명의 구성 및 작용】

<13> 본 발명은 3-디옥시아라비오노헵-톨로소네이트 7-포스페이트(DAHP)을 합성하는 효소, 트립토판 생합성에 관여하는 *trp*, *aroH*, *mtr*, *trpR* 및 *aroL* 오페론을 조절하는 *trpR* 단백질 및 *aroF*-*tyrA*, *aroG* 및 *aroP* 오페론을 조절하는 *tyrR* 단백질을 암호화하는 유전자를 효과적으로 증폭시키기 위해 각 유전자에 대한 프라이머를 사용하여 PCR로 증폭하고 pCR2.1-TOPO 벡터로 클로닝한 후 예상되는 크기의 밴드로 양성반응을 보이는 플라스미드 클론들을 조사하는 단계; 상기한 4종류의 유전자가 들어있는 플라스미드 클론을 주형으로 하여 양방향 염기서열 분석으로 *aroF*, *aroG*, *trpR*, *tyrR* 유전자의 염기서열을 결정하고, 상기 염기서열로부터 번역된 아미노산 서열을 결정한 다음 야생형 유전자의 염기서열과 비교하여 돌연변이가 일어난 부분을 결정하는 단계; 및 변이유전자 *aroF*, *aroG*, *trpR*, *tyrR*를 단독 혹은 다중으로 보유하는 대장균 변이주 CJ285를 이용하여 포도당 함유 발효배지에서 직접 발효법으로 L-트립토판의 생산성을 확인하는 단계로 구성된다.

<14> 한편, 본 발명에서 사용한 유전자 조작방법은 주로 분자클로닝 실험조작법(Molecular cloning a Laboratory manual(T.Maniatis E.F., flicht, J. Sambrook))에 준하여 실시하였다.

<15> 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

<16> 본 발명의 내성 변이균주 CJ285는 트립토판 생산 모균주인 대장균 CJ181(KFCC 10902)을 트립토판 유사체인 THX가 0.3g/ℓ 포함된 평판최소배지에서 5일간 항온 배양하였으나 성장이 이루어지지 않아, THX에 대한 민감도를 해제시키기 위해 돌연변이 유발물질인 NTG를 500μg/ℓ 처리하여 먼저 THX 0.3g/ℓ 가 포함된 최소배지에서 성장을 보이는 균주를 선별한 후, 다시 0.5g/ℓ 가 포함된 최소배지에서 배양하여 THX에 대해 내성을 보이는 균주를 선별하였다. 최소배지의 조성은 하기 표 1과 같고, 영양 요구성 아미노산은 100mg/ℓ 씩 첨가하여 사용하였다.

<17> 【표 1】

대장균 최소배지(M9 배지) 조성	
포도당 최소배지(M9 배지)	
성분	조성(g/ℓ)
포도당	2
NaHPO <sub>4</sub>	6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3
NaCl	0.5
NH <sub>4</sub> Cl	1
MgSO <sub>4</sub>	0.5
CaCl <sub>2</sub>	0.01
타이로신	0.1
pH 7.0	

<18> 본 발명에 의한 변이균주 CJ285를 LB배지(박토티립톤 1%, 박토이스트랙기스 0.5%, 염화나트륨 1% : pH 7.4)에서 37℃, 12시간 진탕배양한 후 균체를 회수하여 Quiagen 염색체 DNA 분리 키트를 사용하여 염색체 DNA를 얻고 에탄올 침전, 건조 등으로 정제하였다. CJ285 변이주에서 분리 정제된 염색체 DNA를 주형으로 하여 PCR을 수행한 후 1% 아가로오스 겔에서 aroF, aroG, trpR, tyrR 변이유전자들의 크기에 해당되는 약 1.3 kb, 2 kb, 530 bp, 1.9 kb의 단편들을 Quiagen 겔 추출 키트를 사용하여 분리, 정제하여 클로닝하기 위한 유전자원으로 사용하였다. CJ285 균주로부터 얻은 상기 변이유전자 단편들을 TOPO 클로닝 키트(Invitrogen 사)를 이용하여 pCR2.1-TOPO 벡터에 클로닝하여 상기 유전자를 포함하는 클론을 확인하였다.

<19> 본 발명 aroF, aroG, trpR, tyrR 단백질을 암호화하는 유전자의 염기서열과 아미노산 서열을 결정하기 위하여 변이유전자를 포함하는 상기 플라스미드를 분리, 정제한 후 프로모터, 유전자 암호 부분, 단백질 합성 종결코돈 이후의 서열을 포함한 전체 유전자 서열을 결정하였다. 본 발명의 상기 유전자들의 DNA 염기서열을 결정하기 위해, 먼저 앞서 분리정제한 플라스미드 상태의 DNA에 서열분석용 프라이머와 증합효소를 혼합한 후 PCR 방법으로 증폭하고 에탄올 침전으로 정제한 후 Hi-Di 용액을 첨가하여 이중나선 DNA를 단일가닥으로 변성시킨 다음 염기서열 분석기 ABI 3100(Applied Biosystem 사)를 사용하여 DNA 염기서열 분석을 진행하였다. 미국의 NCBI(National Center for Biotechnology Information) 웹사이트내 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 검색 프로그램과 ExPasy 웹사이트내 Tools 프로그램(<http://us.expasy.org/tools/dna.html>)을 이용하여 결정한 유전자 염기서열을 야생형 유전자 염기서열과 비교한 후 변이가 일어난 염기를 확인하고 번역을 통하여 변화된 아미노산을 결정하였다.

<20> 본 발명의 상기 변이유전자, aroF, aroG, trpR, tyrR을 단독 혹은 다중으로 보유하는 CJ285 변이주를 이용하여 포도당이 포함된 발효배지에서 직접 발효법으로 L-트립토판을 생산하였다. 상기 변이균주는 호기적 조건(플라스크의 진탕 배양 200-300rpm, 발효조의 경우 교반속도 400-1000rpm 및 통기량 0.5-1.5vvm) 및 배양온도 30℃, pH는 6.0-8.0에서 배양하여 L-트립토판을 배양액에 축적시켰다. 플라스크 배양의 경우에는 배양온도 30℃, 220rpm에서 48-60 시간 배양하여 L-트립토판을 배양액에 축적시켰다. 또한 발효조에서 배양하는 경우, 수회 추가당을 공급하는 유가식 발효법으로 L-트립토판을 생산하였다. 발효배지 성분은 하기 표 2와 같다.

## &lt;21&gt; 【표 2】

발효배지 조성

삼각 플라스크 발효배지		5L 발효조 발효배지	
성분	조성(g/l)	성분	조성(g/l)
포도당	60	포도당	63.16
이스트 추출물	2.5	이스트 추출물	4
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1	시트르산	1.4
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2
구연산나트륨	5	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	7
$\text{NaCl}$	1	타이로신	0.8
타이로신	0.1	푸마르산	1
$\text{CaCO}_3$	40	$\text{CaCl}_2$	0.5

<22> 배양액의 균체 성장 속도는 600nm에서 흡광도로 측정하였으며, 당분석은 버트랜드(Bertrand)법으로 수행하였다. 한편, L-트립토판의 정량은 HPLC로 분석하였다.

<23> 이하, 본 발명의 구체적인 구성과 작용을 당업자가 용이하게 실시할 수 있도록 하기 위하여 구체적인 실시예를 들어 보다 상세히 설명하고자 한다.

<24> 실시예 1: THX 내성 변이주 CJ285의 선별

<25> 트립토판 생산 모균주인 대장균 CJ181(KFCC 10902)을 LB배지(박토틱톤 1%, 박토이스트랙기스 0.5%, 염화나트륨 1% : pH 7.4)에서 약 12시간 동안 37℃에서 진탕배양한 후 멸균된 식염수로 2회 세척하고, 0.1M 구연산염 완충용액(pH5.5)으로 최종 OD가 1.0이 되도록 희석한 후 THX가 0.3g/l 함유된 최소배지(표 1)에서 5일간 배양하였으나 성장이 이루어지지 않아, 화학적 돌연변이로 THX 내성을 부여하기 위하여 돌연변이 유발물질인 NTG 농도가 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 첨가하였다. 이 용액을 37℃ 항온조에서 30분간 반응시킨 후 0.1M 인산염 완충용액(pH

7.0)으로 3차례 세척하고, THX가 0.5g/ℓ 함유된 최소배지(표 1)에서 5일간 배양하여 약 100 여개의 콜로니를 획득하였다. 획득한 변이균주와 기존의 모균주를 플라스크에서 트립토판 발효 시험을 수행한 결과 기존의 대장균 모균주 CJ181에 비해 트립토판 생산이 현격하게 우수한 대 장균 CJ285를 선별할 수 있었다. 획득한 균주 중 L-트립토판 생산이 가장 우수한 균주를 삼각 플라스크 내에서 트립토판 생산 실험을 수행한 후 5L 발효조 실험을 실시해 6과 같이 수행하였 다.

<26> 【표 3】

인공변이 개발균주들의 플라스크 실험결과

대장균	균체량(OD <sub>600</sub> )	L-트립토판(g/l)
CJ181	30	7.1
CJ285	28	7.9

<27> 상기 실시예에서 발효배양액에 축적된 L-트립토판 농도가 모균주인 대장균 KFCC 10902에 비해 향상된 대장균 변이주 CJ285를 2003년 11월 28일자로 사단법인 한국종균협회에 기탁하여 수탁번호 KCCM-10534를 부여받았다.

<28> 실시예 2: 변이균주 CJ285의 aroF 유전자 클로닝 및 서열분석

<29> CJ285 균주에서 분리 정제된 염색체 DNA를 주형으로 하여 aroF 유전자를 PCR로 증폭하기 위해 다음과 같은 프라이머(21-mers)를 사용하였다. 5'-GTATTTACCCCGTTATTGTC-3'를 센스 프라 이머(sense primer)로, 5'-CACTTCAGCAACCAGTTCAG-3'를 안티센스 프라이머(anti-sense primer) 로 사용하였

으며, PCR은 DNA 폴리머라아제, dNTPs 및 반응 완충액(reaction buffer) 등 필요한 성분들을 포함하고 있는 Accupower PCR HL-Premix에 CJ285 균주의 genomic DNA를 약 30ng, 프라이머는 각각 25 pmol을 최종 농도 20ul가 되도록 첨가하여 수행하였다. PCR 프로그램은 초기단계에서는 94℃에서 5분, 94℃에서 35초, 55℃에서 40초, 72℃에서 1분 30초로 하여 25회 수행하고, 72℃에서 마지막 신장(extension)을 7분 동안 수행하였다. 그 결과를 1% 아가로스젤 전기영동으로 확인하였다.

<30>      상기 유전자 단편을 pCR2.1-TOPO 벡터에 클로닝 하기 위해 1% 아가로스젤에서 aroF 변이 유전자의 크기에 해당되는 약 1.3 kb의 단편들을 Quiagen 젤 추출 키트를 사용하여 분리, 정제하여 클로닝하기 위한 유전자원으로 사용하였다. CJ285 균주로부터 얻은 상기 변이 유전자 단편들을 TOPO 클로닝 키트(Invitrogen 사)를 이용하여 pCR2.1-TOPO 벡터 용액과 1:4 부피비율로 혼합한 후 1ul의 소금용액을 첨가한 후 상온에서 20분간 반응을 통해 결합시켰다. 반응액을 키트에 포함된 40ul의 TOP10 competent cell과 혼합한 후 얼음 속에서 20분간 방치하고, 42℃에서 30초간 열충격을 가한 다음 즉시 얼음 속에 넣고 2분간 방치한 후 SOC 배지를 250ul 첨가하여 1시간 동안 37℃ 배양한다. 100ul의 배양액을 엠포실린(50ug/ml)이 들어있는 LB 한천배지에 도말하여 37℃에서 약 12시간 동안 배양한 후, 다시 흰색 콜로니만을 선별하여 엠포실린(50ug/ml)이 포함된 LB 액체배지에 약 12시간 배양하고, 플라스미드를 분리하여 EcoRI 제한효소로 2시간 처리한 다음 1% 아가로스젤 전기영동으로 전개한 후 UV 조명기로 상기 변이 유전자를 포함하는 클론을 확인하였다.

<31>      본 발명의 상기 유전자들의 DNA 염기서열을 결정하기 위해 먼저 앞서 확인된

클론으로부터 플라스미드를 분리정제한 후, aroF 유전자와 상보적인 수소결합으로 결합할 수 있는 서열분석용 프라이머를 2 pmol 첨가하고, 중합효소가 포함된 2ul Big dye, 1ul의 플라스미드 DNA(약 200ng)를 혼합한 후, 96℃에서 30초, 50℃에서 15초, 60℃에서 4분간 25회를 반복하여 PCR을 수행하고, 에탄올 침전으로 정제한 후 10ul의 Hi-Di 용액을 첨가하여 이중나선 DNA를 단일가닥으로 변성시킨 다음 염기서열 분석기 ABI 3100(Applied Biosystem사)를 사용하여 DNA 염기서열 분석을 진행하였다. 미국의 NCBI(National Center for Biotechnology Information) 웹사이트내 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 검색 프로그램과 ExPasy 웹사이트내 Tools 프로그램(<http://us.expasy.org/tools/dna.html>)을 이용하여 결정한 유전자 염기서열을 야생형 유전자 염기서열과 비교한 후 변이가 일어난 염기를 확인하고 번역을 통하여 변화된 아미노산을 결정한다.

### <32> 실시예 3: 변이균주 CJ285의 aroG 유전자 클로닝 및 서열분석

<33> CJ285 균주에서 분리 정제된 염색체 DNA를 주형으로 하여 aroG 유전자를 PCR로 증폭하기 위해 다음과 같은 프라이머(21-mers)를 사용하였다. 5'-GTATTTACCCGTTATTGTC-3'를 센스 프라이머(sense primer)로, 5'-ACTCCGCCGAAGTGACTAA-3'를 안티센스 프라이머(anti-sense primer)로 사용하였으며, PCR은 DNA 폴리머라아제, dNTPs 및 반응 완충액(reaction buffer) 등 필요한 성분들을 포함하고 있는 Accupower PCR HL-Premix에 CJ285 균주의 genomic DNA를 약 30ng, 프라이머는 각각 25 pmol을 최종 농도 20ul가 되도록 첨가하여 수행하였다. PCR 프로그램은 초기 단계에서는 94℃에서 5분, 94℃에서 35초, 55℃에서 40초, 72℃에서 2분 20초로 하여 25회 수행하고, 72℃에서 마지막 신장을 7분 동안 수행하였다. 그 결과를 1% 아가로스겔 전기영동으로 확인하였다.



<34>     상기 유전자 단편을 pCR2.1-TOPO 벡터에 클로닝하기 위하여 aroG 변이유전자의 크기에 해당되는 약 2 kb의 단편들을 Quiagen 겔 추출 키트를 사용하여 분리, 정제하고 이를 클로닝하기 위한 유전자원으로 사용하였다. 이하, 실험과정 및 염기서열 결정 후의 염기서열 분석은 실시예 2의 방법과 같이 수행되었다.

<35>     실시예 4: 변이균주 CJ285의 trpR 유전자 클로닝 및 서열분석

<36>     CJ285 균주에서 분리 정제된 염색체 DNA를 주형으로 하여 trpR 유전자를 PCR로 증폭하기 위해 다음과 같은 프라이머(21-mers)를 사용하였다. 5'-CGCCACGGAATGGGACGTCG-3'를 센스 프라이머(sense primer)로, 5'-CCGCGTCTTATCATGCCTACC-3'를 안티센스 프라이머(anti-sense primer)로 사용하였으며, PCR은 DNA 폴리머라아제, dNTPs 및 반응 완충액(reaction buffer) 등 필요한 성분들을 포함하고 있는 Accupower PCR HL-Premix에 CJ285 균주의 genomic DNA를 약 30ng, 프라이머는 각각 25 pmol을 최종 농도 20ul가 되도록 첨가하여 수행하였다. PCR 프로그램은 초기단계에서는 94℃에서 5분, 94℃에서 1분, 60℃에서 30초, 72℃에서 1분으로 하여 25회 수행하고, 72℃에서 마지막 신장을 7분 동안 수행하였다. 그 결과를 1% 아가로스겔 전기영동으로 확인하였다.

<37>     상기 유전자 단편을 pCR2.1-TOPO 벡터에 클로닝하기 위하여 trpR 변이유전자의 크기에 해당되는 약 530 bp의 단편들을 Quiagen 겔 추출 키트를 사용하여 분리, 정제하고 이를 클로닝하기 위한 유전자원으로 사용하였다. 이하, 실험과정 및 염기서열 결정 후의 염기서열 분석은 실시예 2의 방법과 같이 수행되었다.

<38> 실시예 5: 변이균주 CJ285의 tyrR 유전자 클로닝 및 서열분석

<39> CJ285 균주에서 분리 정제된 염색체 DNA를 주형으로 하여 tyrR 유전자를 PCR로 증폭하기 위해 다음과 같은 프라이머(21-mers)를 사용하였다. 5'-GGATTGACGATGACAAACCT-3'를 센스 프라이머(sense primer)로, 5'-CTGGTGGATGAAATCACCAC-3'를 안티센스 프라이머(anti-sense primer)로 사용하였으며, PCR은 DNA 폴리머라아제, dNTPs 및 반응 완충액(reaction buffer) 등 필요한 성분들을 포함하고 있는 Accupower PCR HL-Premix에 CJ285 균주의 genomic DNA를 약 30ng, 프라이머는 각각 25 pmol을 최종 농도 20ul가 되도록 첨가하여 수행하였다. PCR 프로그램은 초기 단계에서는 94℃에서 5분, 94℃에서 1분, 53℃에서 30초, 72℃에서 2분 20초로 하여 25회 수행하고, 72℃에서 마지막 신장을 7분 동안 수행하였다. 그 결과를 1% 아가로스겔 전기영동으로 확인하였다.

<40> 상기 유전자 단편을 pCR2.1-TOPO 벡터에 클로닝하기 위하여 tyrR 변이유전자의 크기에 해당되는 약 1.9 kb의 단편들을 Quiagen 겔 추출 키트를 사용하여 분리, 정제하고 이를 클로닝하기 위한 유전자원으로 사용하였다. 이하, 실험과정 및 염기서열 결정 후의 염기서열 분석은 실시예 2의 방법과 같이 수행되었다.

<41> 실시예 6: 변이균주 CJ285의 5L 발효조 실험

<42> 상기 실시예 2 내지 5를 통해 밝혀진 염기서열의 변이유전자를 단독 혹은 다중으로 보유하는 대장균 CJ285와 모균주인 CJ181(KFCC 10902)를 5L 발효조에서 배양온도 30℃, 배양 pH 6.9-7.1(암모니아수로 pH 조정), 통기량 0.5-1.0vvm 및 교반속도 500-700 rpm을 유지하면서 유가식으로 배양하였다. 이 때, 발효농도는 각각 CJ285가 28.2g/ℓ, 모균주인 CJ181이 25.1g/ℓ

이었으며, 대장균 CJ285의 경우 발효시간이 소폭 단축됨으로써 결과적으로 모균주인 CJ181보다 시간당 약 10% 정도의 생산성 향상이 있었다.

<43> 【표 4】

CJ285 변이균주에 대한 5L 발효 실험결과

균주명	배양시간(hr)	총당(g/l)	L-트립토판 축적량(g/l)
CJ181	63	243.5	25.1
CJ285	61	243.5	28.2

【발명의 효과】

<44> 이상 설명한 바와 같이 본 발명은 대장균 CJ181에 NTG를 반복적으로 처리하여 돌연변이 유발 후 트립토판 유사체인 트립토판 하이드록사메이트에 대한 내성을 부여하여 신규한 대장균 변이주 CJ285(KCCM-10534)를 개발하였고, 트립토판 대사에 관여하는 중요 변이유전자 *aroF*, *aroG*, *trpR*, *tyrR*의 DNA 염기서열과 아미노산 서열을 분석하여 의미있는 돌연변이를 확인하여 향후 재조합 균주개발에 적합한 변이유전자를 확보하였다. 또한, 모균주 CJ181에 비하여 상기 변이유전자를 단독 혹은 다중으로 보유하는 본 발명 변이주 CJ285는 약 10% 정도의 트립토판 생산성 향상을 보임으로써 재조합 균주개발에 적합한 모균주로 기대되며, 따라서 아미노산 발효산업 및 의약품산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

트립토판 생합성 변이유전자 *aroF*, *aroG*, *trpR*, *tyrR*을 단독 혹은 다중으로 보유하는 L-트립토판을 생산하는 대장균 변이주.

【청구항 2】

제 1항에 있어서 대장균 변이주는 CJ285(KCCM-10534)임을 특징으로 하는 변이주.

【청구항 3】

제1항 또는 제2항의 대장균 변이주를 사용함을 특징으로 하는 L-트립토판의 제조방법.

## 【도면】

## 【도 1】

cagaggtaggggttgaaagcgcgactaaattgctgtgttaataaaaaatgtacgaaataatggat  
 tgaanaactttactttatgtgtatcgttacgtgtctcctcgttaggtatcaactatogcaaacgagc  
 atanaacggatcgccatcatgcaaaaagcgcgcgtgaataacgtacatataccgacgaacagg  
 ttttaattgactccggaacaaactgaaggcgcgttttccatbgagccatgaacaaagaaagccagat  
 tgcctgactcgcgtanaagcatttocagatatatcgcgggcgcgacccctcgtctgttggtagta  
 .gtgggtcccttggtccattcatgacccggaactgctctggaatatgctcgtcgaattanaagccc  
 ttgcccgcagaggatagcctctatctggttaatgcgcgtctcttttgaanaaccccgtaac  
 cactgctcgcgttggaagggttaattaacgaccccccatatggatggctcttttgatgtagaagcc  
 gggtcgcagatcgcgcgttaatttgccttgagctgggtgaatatgggactgcactggcgacgg  
 aagcgttagatccgaatagcccgcaatccctggcgatctggttagctggctacgaattgggtgc  
 tctataacgggaatcgcaaacacacgtgaattggctccgggtctccatgcccgttggtttt  
 aaaaaacggcaccgacggcagctctggcaacagcaattaacgctatgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc  
 accgtcttggttggtatataccagcgaggcgaggttgctgtctacaaactcaggggaatccgga  
 cggccatgtgatctgcgcgggttggaagcgcgaactatagccctgcggatgtgctgcaatgt  
 gaaaagagatggaacaggcgggactgcgcgcctctctgtatggtagatgtagcgcacggtaatt  
 ccaatnaagattatcgccgtcag[lot]gggtggcagaatccgtggttgctcaaatcaagat  
 ggcaatcgcctcaatatttggtctgatgacgaagtaatatccacgagggcaatcagctctccg  
 agcaacccgcagtgaaatgaaatcacggtgtaaccgtacgctgcctagctagggaat  
 gaccgatgctctgctgcgtgaaattcatcaggtatctgaacgggcagctgacggctcgcgtggct  
 taagaggtttatattggtgctgaattgacgcgattacgcgatcaaatgatgaagtcgataaa  
 gcgctgcgtgaatttatagcgaagcgtctggaactgggtgctgaagtg

## 【도 2】

acagtcagaaataatgtggccagttttgtcatttcataggatgctcctgtttatggtcgttatg  
 tcggataacccctttccacagtgcatttgcaggtgaataaaggcattggttttaagatttcagc  
 caggttatgaaacgcagcagagaatcttgaaataatatacaaacaaaggagtacagttagaaa  
 ttgttaggagagatcctgttttctgcgacaaactggcgtttttcttgctaatccaggatataac  
 [l]gtctcatagtgtanaaccccggttacacattctgaacgaagatatagatttgaagatttgca  
 ttcactaagataagttatggcaacacacggaaacagacatgaattatcagaacgacgatttacgat  
 caaagcaatcaagagttacttccctctgtgcatttgcgtggaanaattcccccgtactgaanaat  
 gcccgaatacgggttgcccatgcccgaagcgatccatagaatcctggaaggttaagtgatgc  
 gcctgtttgggt[gg]atggccca[gg]tcaattccatgacccgtgcgggcaaaagagtgatg  
 ccaactcgtctgttggtgcctgctgaagagctgaagagtgagctggaaatcgtaatgcgcgtcta  
 ttttgaaagcccggtacacgggtgggttggaagggtgattaacgataccgcatatggatatt  
 agcttccagatacaacgaacgggtctggtatagcccgtaaatctgctgtgatataacgaacagc  
 gctgcgcagcggcagggtgagttctcgatagatcaccccaaatatctgcgtgacatgagtgag  
 ctggggcgcgaattggcgcacgtacacgaatcgaggtgacccgcgaactggcatcagggctt  
 tcttgctcggctcggcttcaaaaatggcaccgacgggtacgatanaagtggtatcagatgcat  
 atgcccgcgggtgcgcgcactgcttccctgtccgtaacgaatgggggcatccgggattgtgaa  
 taccagcggtaacggcgttgccatcatctgcgcggcggtaaagagcctaactacagcgcg  
 aagcaagttgctgaagtgaaagagggctgaacaaagcagggctgcagcagcaggtgatgcg  
 atttcagcctatgctaaactcgtccaaacaaatcaaaaagcagatggatgtttgtgctgacgtttg  
 ccagcagattgcgggtggcgaagggcatattggcgtgagtggtggaaagccatctggtgga  
 ggaatcagagcctcgagagcggggagcgcgtggcctacggtaagagcatcccgatgctgca  
 tcggctgggaagataccgatgctctgttacgtcaactggcgaaatgagtaaaagcgcgtcgcgg  
 gtanaaggtttaatgttcggatgcgcgtcagagtgggctatccgatgaatcacacagggctgat  
 aagtcgcgcagcgtcgcatcaggaatgtgctccattgttagcaacaaanaagcgcactcaact  
 gcagtcggctttctcattttaagaaatgacgtttacttcgcttaccctgggttgcaacc

## 【도 3】

atggcccaacaaatcccttatcagcagcagatggcagaacagcgtcaccagggagtggttacgtt  
 ttgtgcactgcttaagaaatgcttaccaaaacgatactccattacccgttggttaaacctgatgct  
 gacgcagatgagcgcgaagcgttggggactgcgtcggtattgtcgaaagcgtgttgccgggc  
 gaaatgagccagctgagttaaaaaatgaactcggcgcagggcatccgacgattacgcgtggat  
 ctacacgcttgaaagcgcgcgcgtcgagctgcgcagtggtggaaagaggtgtgttgaaan[  
 ogattgattttgttaggootgalaagagtgggogootaaggaatcgtgcaacgaatgocggatgo  
 ggggtga]

## 【도 4】

tgcaatatcgggtgctgaccggatatctttacgcgaagtgcggctttttccgtctttgtgtca  
atgatgtgtgacagaaaccttcttgctatccaaatagtgatcatcatatatttattgttctt  
ttttcaggtgaagggttcccatgcgctctggaagtcttttgtaagaccgactcggctcgaaccgc  
gaattactcgatctactcgtgctaaga[ga]attgatttacggcggtattgagattgatcccat  
tggggcaatctaccctcaattttgctgaactggagtttgagagtttcagcagctctgatggccgaa  
atcgcgcgtattgcgggtgttaccgatgtgctactgtccgtggatgacctccgaacgtgagc  
atctggcggttgagcgcgtta[cta]gaggcgttgccctgaacctgtgctctctgtcgatatgaa  
agcaangtggtatggcggaaccggcgagctgtcagctttttggggcaaaattggtatcgccctgc  
gcaaccataccgcgcacaattgattaacggctttaattttttacgttggtctggaaagcgaacc  
gcaagatccgcatcaacgagcatgtcgttatatggcgagaatttcctgatggagattacgcct  
gtttatcttcaggatgaaatgatcaacacgtcctgaccggtgcggtggtgatgttgcatcaa  
cgattcgtatgggcgcagcttgcaaaatgtgcgcgccaggacgtcagcgccttcagtcgaat  
tgtcgcgctcagcccgaaatgaagcatgtgtcgacaaggcgagaaactggcgatgctaaagc  
gcgcgcgtgtctgatbacgggtgacacaggtacaggtaaagatctctttgcctacgcctgacctc  
agggcaagcccgagcgggcaaaccttaccctggcgctgaactgtgtcgtctataccggaaagtgc  
ggctcgagagtgaactgtttggctatgtctccggaagggaagaaggatctcttgagcaggcgaaac  
ggtgggttcggtgctgttggtatgaataggggaaatgtcaccacggatgcaggcgaaattactgc  
gtttccttaattgatggcactttccgtcgggttgggcgaagaccatgaggtgcatgtcgatgtgg  
ggtgattttcgcgtacgcagaagaatctggtcgaactggtgcgaaggaatgtttccgtgagat  
ctctattatctgtctgaactgtttgacgtcctaatctgcgcgcgtacgtgactgtccgcaggaca  
tcatgccgttaactgagctgttcgtcgcgcgttttgccgacgagcaggcgctgcgcgtccgaa  
actggcgctgacctgaatactgtacttaccggttatgctggccgggaaatgtgcggcagttta  
aagaacgtatctatcgcgcactgacacaaactggacggttatgagctgctccacaggatattt  
tgttgccggatttatgacgcgcgaacggttagcgtggcggaagatgcgatggaaggttcgtgga  
cgaaatcaccagccgtttgaacgtcgggtatcaaccagcttttatcgcaattatccagcacg  
cgcaaacggcgcaaacgtctcggcggtttcacataccgcgattgccaatagttgcgggaatatgg  
tctgagtcagaagaagcagagagaaggcggaatatgacctgatggtgcacacacatcaggca  
tatcaaatatgctttcagtcacgcagagctgcttcgttaaccggctcgggtggtgatttcac  
caccag